

**Über die Beziehung zwischen Reihenverdünnungstest
und Blättchentest am Beispiel der
Tetrazykline
Minocyclin, Tetracyclin, Doxycyclin**

Iris Hofmann

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553812_0078

Aus der 1. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof.Dr.H. SCHWIEGK

Über die Beziehung zwischen Reihenverdünnungstest und
Blättchentest am Beispiel der
Tetrazykline
Minocyclin, Tetracyclin, Doxycyclin

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Iris H o f m a n n
München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. W. LANG
Mitberichterstatter : Prof. Dr. J. KARL
Dekan : Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 10. 1976



INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG

- I. Darstellung des Problems 1

B. BESCHREIBUNG DER METHODIK

- I. Hemmhoftest - allgemeine Darstellung und Beschreibung der Faktoren, die die Ergebnisse des Tests beeinflussen.
 - 1. Nährmedium 3
 - 2. Die Agartiefe 3
 - 3. Trocknungszeiten und Prädiffusion 4
 - 4. Das Inoculum 4
 - 5. Hemmhoftzonen 5
- II. Reihenverdünnungstest - allgemeine Darstellung und Beschreibung der Faktoren, die die Ergebnisse des Tests beeinflussen.
 - 1. Wirkstofflösungen 5
 - 2. Verdünnungsreihe 6
 - 3. Inoculum 6
 - 4. Bestimmung der MIC (minimale Hemmkonzentration) 7

C. DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE

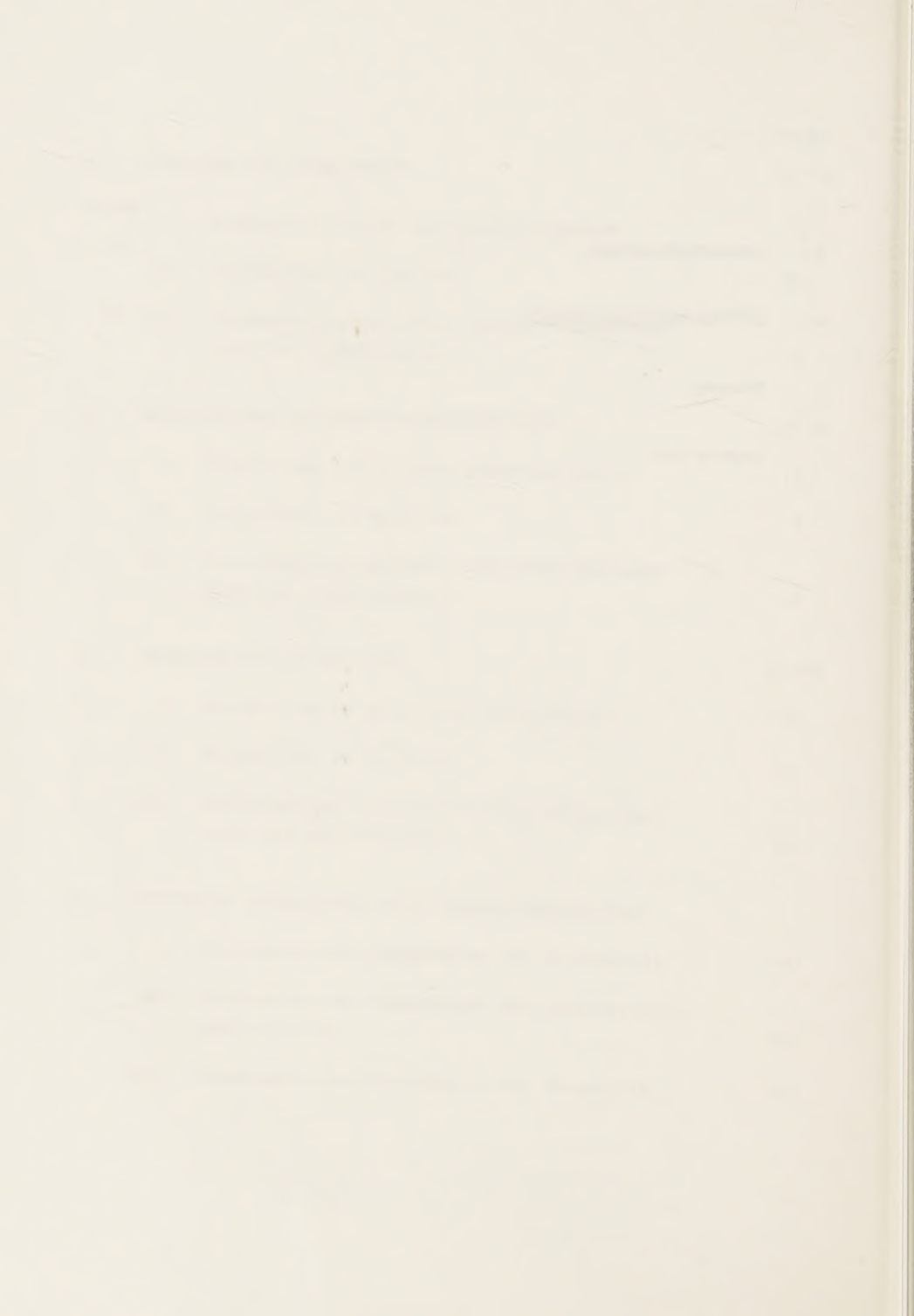
- I. Reihenverdünnungstest 8
 - 1. Untersuchungsmaterial 8
 - 2. Verwendete Nährmedien 8
 - 3. Wirkstofflösungen 8
 - 4. Ausführung 9
- II. Durchführung des Blättchentests
 - 1. Untersuchungsmaterial 10
 - 2. Verwendete Nährböden 11
 - 3. Verwendete Disks (Testblättchen) 11
 - 4. Ausführung 11

	Seite
D. VERSUCHE MIT MINOCYCLIN	12-18
I. Ergebnisse im Reihenverdünnungstest	12
II. Ergebnisse im Disktest	12
III. Zusammenhang zwischen Reihenverdünnungs- test und Blättchentest	12
E. VERSUCHE MIT TETRACYCLINHYDROCHLORID	19-24
I. Ergebnisse im Reihenverdünnungstest	19
II. Ergebnisse im Disktest	19
III. Zusammenhang zwischen Reihenverdünnungs- test und Blättchentest	19
F. VERSUCHE MIT DOXYCYCLIN	25-30
I. Ergebnisse im Reihenverdünnungstest	25
II. Ergebnisse im Disktest	25
III. Zusammenhang zwischen Reihenverdünnungs- test und Blättchentest	25
G. KRITISCHE BETRACHTUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE	
I. Diskussion der Ergebnisse mit Minocyclin	31
II. Diskussion der Ergebnisse mit Tetracyclin- hydrochlorid	35
III. Diskussion der Ergebnisse mit Doxycyclin	38

	Seite
H. ZUSAMMENFASSUNG	41
J. LITERATURVERZEICHNIS	42

Anhang

Lebenslauf



A. EINLEITUNG

I. Darstellung des Problems

Zur Prüfung der Empfindlichkeit von Bakterienpopulationen gegenüber Antibiotika und Chemotherapeutika werden Testmethoden verwendet, die auf verschiedenen Verfahren beruhen und sich hinsichtlich des Aussagewertes ihrer Ergebnisse erheblich unterscheiden:

der Reihenverdünnungstest (RVT) und
der Hemmhofest (Blättchentest).

Einschränkend gilt darüber hinaus, daß die Ergebnisse solcher Messungen niemals absolute Werte darstellen, sondern erheblich von Testbedingungen abhängen, die leider bis heute noch nicht international standardisiert werden konnten.

Im Reihenverdünnungstest wird die Empfindlichkeit einer Bakterienpopulation gegenüber einem Antibiotikum bzw. Chemotherapeutikum gemessen, dessen Konzentrationen quantitativ abgestimmt sind. Die MIC (minimale Hemmkonzentration) des Antibiotikums ist dabei ein direktes Maß für die Empfindlichkeit der betreffenden Bakterienpopulation. Der Reihenverdünnungstest gilt als bisher genaueste Meßmethode, und die dort festgestellte MIC als Bezugsgröße, die den Meßdaten der anderen Meßmethode, dem Blättchentest, gegenübergestellt wird, siehe Ericsson-Sherris: (1) "The basic point of reference should be the MIC determined under reproducible conditions". Da der Reihenverdünnungstest einen sehr großen zeitlichen und materiellen Aufwand bedingt, ist er für Routineuntersuchungen in der Praxis kaum geeignet.

Dort wird der Agar Diffusionstest als schnelle, zeitsparende, unkomplizierte Methode zur Empfindlichkeitsbestimmung von Bakterienpopulationen gegenüber Antibiotika und Chemotherapeutika angewandt. Auf einer beimpften Agarplatte wird ein antibiotikagetränktes Papierblättchen aufgelegt. Die Empfindlichkeit der Bakterienpopulation gegenüber diesem Antibiotikum kann aus dem Auftreten eines Hemmhofes qualitativ bestimmt werden, wobei je nach Hemmhofgröße (in mm) noch eine Abstufung in hochempfindlich, mäßig empfindlich, kaum empfindlich und resistent üblich ist.

In verschiedenen Arbeiten wurde jedoch immer wieder darauf hingewiesen, daß diese Abstufung, basierend allein auf der Hemmhofgröße, die in der Routine vorgenommen wird, nicht zulässig sei, solange die Standardisierung der Testmethoden nicht erreicht ist.

(2)

Die vorliegende Studie will nun mit drei verschiedenen Tetrazyklinen - Minocyclin, Tetracyclinhydrochlorid, Doxycyclin - untersuchen, inwieweit eine Korrelation zwischen der im Reihenverdünnungstest festgestellten Empfindlichkeit (MIC) und der Hemmhofgröße (in mm) im Blättchentest besteht.

B. BESCHREIBUNG DER METHODE

I. Hemmhofstest - allgemeine Darstellung und Beschreibung der Faktoren, die die Ergebnisse des Tests beeinflussen.

1. Nährmedium

Zunächst wird in Petrischalen von etwa 9 cm Durchmesser das flüssige Agarnährmedium eingegossen, das dann erkaltet. Dabei ist für die Größe des später gefundenen Hemmhofes die Art des benutzten Agars (Nährmedium) von großer Bedeutung. Diffusion und Aktivität der in vorliegender Studie verwendeten Tetrazykline hängen wesentlich von der Art des verwendeten Nähragars ab. So sind z.B. die durchschnittlich gefundenen Hemmhofzonen bei Verwendung von MH Agar (Müller Hinton Agar) signifikant kleiner als bei der Verwendung von TS Agar (Trypticase soy Agar).

Wir verweisen diesbezüglich auf Jay Sherris (3), der die Unterschiede bei der Testung von E.Coli mit Tetrazyklinen bezüglich Hemmhofgröße und minimalen Hemmkonzentrationen untersuchte bei Verwendung einerseits von MH Agar und andererseits von TS Agar.

Andere Untersuchungen von Weinberg (4) berichten über einen Mechanismus der Inaktivierung von Tetrazyklinen durch freie zweiwertige Kationen im verwendeten Nährmedium.

Untersuchungen von Klustersky Daneau (5) bei der Testung von Minocyclin ergaben bei entsprechenden minimalen Hemmhofkonzentrationen durchschnittlich kleinere Hemmhofgrößen als andere Untersuchungen z.B. von Frisk Tunevall (6). Als Ursache wird ein noch nicht genau definierter Hemmstoff in dem von Klustersky Daneau verwendeten MH Agar angesehen.

Weitere Untersuchungen bezüglich verschiedener Nährmedien bei der Antibiotikatestung s.a. Washington J.A. Yu P. K.W. und Martin W.Y. (7) und (8).

2. Die Agartiefe

Die Agartiefe, normalerweise 4 mm, ist bei vielen verwendeten Wirksubstanzen von gewissem Einfluß auf Diffusion und Hemmhofgröße. Wie sich durch Untersuchungen von Gezelius und Sherris (8)

zeigte, werden jedoch Hemmhofzonen von Tetrazyklinen im Gegensatz zu denen von Penizillinen u.a. durch Unterschiede in der Agartiefe von 2 mm bis 8 mm nicht beeinflusst, siehe auch Untersuchungen von Bauer A.W. (9) und Ericsson H. (10) über den Einfluß von Agartiefe und Hemmhofzonen.

3. Trocknungszeiten und Prädiffusion

Bezüglich des Einflusses von Trocknungszeiten der frisch ausgegossenen Agarplatten wurde durch Untersuchungen von Bourgeois (12) u.a. festgestellt, daß, je größer die Trocknungszeiten vor Anbringen der Blättchen, desto kleiner die entstehenden Hemmhöfe sind. In Übereinstimmung mit Richtlinien von Ericsson und Sherris wurde in vorliegender Studie eine Trocknungszeit von 30 Minuten bei 37° Celsius durchgeführt.

Nach der Beimpfung wurden die Testblättchen auf die Agaroberfläche gelegt und leicht angepreßt. Eigene Untersuchungen zu einer Prädiffusion bei Zimmertemperatur ergaben keinen wesentlichen Einfluß auf die später ausgebildeten Hemmhofzonen.

4. Das Inoculum

Untersuchungen von Barry Caudill und Sherris (11) ergaben, daß die beste Methode zur Erhaltung eines in etwa konstanten Inoculums die Verdünnung einer voll gewachsenen Bouillonkultur ist. Dabei ist die optimale Verdünnung der Einsaatmenge erreicht, wenn die auf der Agarplatte gewachsenen Bakterienkolonien einzeln dicht beieinander stehen, ohne ineinander zusammenzufließen. Für E. Coli-Einsaat entspricht dies etwa einer Bewachsung der Agarplatten von 1 700 Kolonien pro cm^2 .

Einer der wichtigsten Faktoren, die die Ergebnisse des Blättchentests beeinflussen können, ist die Einsaatdichte der Bakteriensuspension, mit der die Agarplatte beimpft wird. Eine zu dünne Rasenbildung führt zu einer unregelmäßigen Ausbildung des Hemmzonenrandes, was zu stark variierenden Hemmhofdurchmessern führen kann, die im allgemeinen dann zu groß ausfallen. Die Keime gelten dann als stärker sensibel, als es der Wirklichkeit entspricht.

Eine zu dichte Rasenbildung auf der Agarplatte führt zur Verklei-

nerung der Hemmhofdurchmesser, was wiederum eine Verfälschung der Ergebnisse mit sich bringt, denn die Keime erscheinen resistenter, als es der Wirklichkeit entspricht.

Da in vorliegender Studie Agardiffusionstest und Reihenverdünnungstest parallel laufend durchgeführt werden sollten, mußte hier eine Kulturverdünnung gefunden werden, die als Inoculum für den Reihenverdünnungstest geeignet war, gleichzeitig aber zu der gewünschten Rasendichte auf der Agarplatte führte.

5. Hemmhofzonen

Auf den beimpften Agarplatten tritt nach einer über-Nacht-Inkubation von 18 Stunden bei 37° Celsius eine mit bloßem Auge sichtbare Rasenbildung durch Bakterienkolonien auf. Die Hemmhofzonen erscheinen dann als eine zirkuläre wachstumsfreie Zone um die Testblättchen herum auf der sonst mit Bakterienkolonien dicht bewachsenen Agarplatte.

II. Reihenverdünnungstest - allgemeine Darstellung und Beschreibung der Faktoren, die die Ergebnisse beeinflussen.

Für die Feststellung der minimalen Hemmkonzentration werden Reihenverdünnungstests durchgeführt.

1. Wirkstofflösungen

Zunächst werden Antibiotikallösungen hergestellt, wobei die Pufferkapazität der verwendeten Lösungsmittel von Bedeutung für die in-vitro-Aktivität der Antibiotika sein kann. Untersuchungen von Klustersky und Daneau (5) mit Testungen der drei Tetrazykline - Minocyclin, Tetracyclinhydrochlorid, Doxycyclin- bei pH Werten von 7 und 5 zeigen, daß bei einem pH Wert von 5 die Aktivität der Tetrazykline gegenüber den getesteten Bakterien gesteigert war, bei Minocyclin und Doxycyclin geringgradig, bei Tetracyclinhydrochlorid in stärkerem Ausmaß.

2. Verdünnungsreihe

Eine geometrische Reihe von 10 Konzentrationsstufen der Wirkstofflösungen wird hergestellt, wobei die Serumspiegel, die durch die therapeutischen Antibiotikagaben in vivo erreicht werden, für die Konzentrationen der Verdünnungsreihe in vitro berücksichtigt werden. Bei einer Therapie von 200 mg Minocyclin werden Serumspiegel von 2 mcg/ml erreicht (13, 14), während dagegen bei mehrtägigen therapeutischen Doxycyclingaben Serumspiegel bis zu maximal 5,1 mcg/ml erreicht werden (15, 16).

Sehr viel höhere Konzentrationen entstehen in Urin und Galle durch die Konzentrierung beim Ausscheidungsvorgang; siehe dazu die Pharmakinetik der betreffenden Tetracykline (17, 18, 19, 20). Die Berücksichtigung der in vivo erreichten Serumspiegel führt dazu, von den Antibiotikallösungen eine Verdünnungsreihe in 10 Röhrchen von folgenden Konzentrationen herzustellen: für Minocyclin mit 20 10 ... mcg/ml Probe, für Tetracyclinhydrochlorid ebenfalls mit 20 10 ... mcg/ml Probe, für Doxycyclin mit 40 20 ... mcg/ml Probe. Dabei liegen die höchsten Konzentrationen noch erheblich über den therapeutisch erreichbaren Serumspiegeln, sodaß eventuell auftretende Hemmhofzonen bei Keimen, deren Sensibilität noch oberhalb des therapeutischen Bereiches liegt, noch mit der minimalen Hemmkonzentration in Beziehung gesetzt werden können.

3. Inoculum

Die Größe des Inoculums ist für die minimale Hemmkonzentration, die in der Verdünnungsreihe erhalten wird, von entscheidender Bedeutung. In unseren Studien wurde eine Einsaatmenge von 10^6 bis 10^7 Organismen pro ml (Koloniebilder) ausgewählt. Die Verdünnung erfolgte bei einer voll bewachsenen Bouillonkultur in früh stationärer Wachstumsphase mit steriler Bouillon der gleichen Zusammensetzung. Wir folgten dabei Empfehlungen für die Standardisierung der Inocula der Verdünnungstests, die H.M. Ericsson und J.C. Sherris in der Int. Collaborative Study "Antibiotica Sensitivity Testing" aufgestellt haben (1).

Es muß einschränkend dazu ausgeführt werden, daß diese auch in vorliegender Studie verwendete Methode eine gute Reproduzierbarkeit

für die Einsaatmengen der jeweiligen Bakterienspezies ergibt, daß aber in der Einsaatmenge innerhalb verschiedener Spezies des gleichen Stammes (hier E. Coli) bei derselben Verdünnungsmethode doch erhebliche Unterschiede entstehen können, siehe auch Untersuchungen von Griffith and Mullins (21).

4. Bestimmung der MIC (minimale Hemmkonzentration).

Nach Zusatz einer solchermaßen verdünnten Bakteriensuspension zu den Antibiotikallösungen wird nach einer über-Nacht-Bebrütung von 18 Stunden bei 37° Celsius dasjenige Kulturröhrchen, das in der größten Verdünnung des Antibiotikums kein Bakterienwachstum aufweist, bestimmt. Es enthält die minimale Hemmkonzentration für den verwendeten Bakterienstamm.

C. DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE

I. Reihenverdünnungstest

Getestet wurden 50 verschiedene, aus Patientenurin isolierte Erregerstämme der Gattung *Escherichia Coli*, die aus dem Untersuchungsmaterial des bakteriologischen Labors der Medizinischen Fakultät der Universität München stammen.

Herstellung des Inoculums: Dazu wurde mittels einer sterilen Öse von einer Kolonie der auf Agarplatten vorgetesteten *E. Coli*-Kultur Material in 15 ml Bouillon übertragen und 18 Stunden bei 37° Celsius bebrütet.

Die Verdünnung erfolgte durch Einpipettierung von 1 Tropfen der dicht bewachsenen, stark getrübbten Bouillonkultur in 25 ml sterile Bouillon. Eine in mehrfachen Kontrolluntersuchungen von uns vorgenommene Keimzahlbestimmung der Verdünnung ergab eine Einsaatmenge die zwischen 10^6 und 10^7 Keimen pro ml Inoculum schwankte. Im Reihenverdünnungstest war durch diese Verdünnung die in-Vitro-Wirksamkeit der verwendeten Tetrazykline gut gewährleistet; vergleiche die Untersuchung von Klastersky (5) und Daneau über die Abhängigkeit der Effektivität verschiedener Tetrazykline von der Größe des Inoculums.

2. Verwendete Nährmedien

Als Nährmedium wurde difco Bouillon verwendet, die zur Vorkultur, Verdünnung und zum Verdünnungstest herangezogen wurden. Bei der Herstellung des Inoculums mußte eine Bakterienverdünnung gefunden werden, die sowohl den Anforderungen des Reihenverdünnungstestes (Einsaatmenge zwischen 10^5 und 10^7 Keimen pro ml) als auch denen des parallel laufenden Blättchentestes (dichter Rasen aus noch einzeln stehenden Kolonien auf der Agarplatte ohne Konfluenz) entsprechen sollte. Diese Bakterienverdünnung diente als Inoculum für beide Tests, Reihenverdünnungstest und Blättchentest.

3. Wirkstofflösungen

Verwendet wurden Minocyclin (Klinomycin) und Tetracyclinhydrochlorid (Achromycin), beide von der Fa. Lederle, und Doxycyclin

(Vibramycin) von der Fa. Pfizer als pulverisierte Trockensubstanzen, aus denen täglich neu Wirkstoffstammlösungen angesetzt wurden. Dazu wurden 50 mg Minocyclin in 50 ml 0,1 n HCL Lösung, 30 mg Tetracyclin Na Cl in 30 ml 0,1 n HCL Lösung und 10 mg Doxycyclin in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst, sodaß eine Stammlösung von jeweils 1000 mcg/ml vorlag.

Da die drei verwendeten Substanzen proteingebunden und somit hinsichtlich ihrer Wirkung pH abhängig sind, siehe Klastersky und Daneau (5), wurden für die weiteren Verdünnungen folgende Pufferlösungen verwendet:

Minocyclin	Phosphatpuffer von pH 4,5
Tetracyclinhydrochlorid	Phosphatpuffer von pH 4,5
Doxycyclin	Phosphatpuffer von pH 6,5

Damit wurden die Stammlösungen zunächst so verdünnt, daß für Minocyclin und Tetracyclinhydrochlorid Ausgangskonzentrationen von 40 mcg/ml im ersten Teströhrchen und 30 mcg/ml im ersten Kontrollröhrchen vorlagen, für Doxycyclin Ausgangskonzentrationen von 80 mcg/ml im ersten Teströhrchen und 60 mcg/ml im ersten Kontrollröhrchen; vergleiche dazu die bei therapeutischer Dosierung erreichten Serumblutspiegel von Doxycyclin bis 5,1 mcg/ml (15) und (17) und Minocyclin von 2-4 mcg/ml (13) und (17). Nach Zusatz einer verdünnten Bakteriensuspension gleichen Volumens kommt es zu einer Endkonzentration der Antibiotika von jeweils der Hälfte der oben angegebenen Konzentrationen pro ml.

4. Ausführung

Pro getestetem Keim wurde mit jeder Substanz eine Testreihe und eine Kontrollreihe aus je 10 Röhrchen gebildet; die sterilen Reagenzröhrchen waren aus Plastik, lichter Durchmesser 12 mm mit sterilem Plastikstopfen. Die weitere Verdünnung der Ausgangskonzentrationen in den Röhrchen erfolgte mit dem Verdünnungsfaktor 2, das heißt: Die nachfolgenden Röhrchen enthielten jeweils 50% der Antibiotika-Konzentration der vorangegangenen. Die Ausgangskonzentration in der Kontrollreihe war so angesetzt, daß die Antibiotika-Konzentrationen in den Röhrchen der Kontrollreihe jeweils Zwischenwerte zu den Konzentrationen zwischen zwei Röhrchen der Testreihe

darstellten. Dadurch wurde neben einer gewissen Kontrolle der Ergebnisse in der Testreihe gleichzeitig eine noch genauere Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration auch hinsichtlich der Zwischenwerte ermöglicht.

Die Versuchsansätze enthielten Volumina von 1 ml Wirkstofflösung pro Röhrchen. Jedem Röhrchen wurde 1 ml Inoculum zugefügt. Die Endkonzentrationen betrugen also bei

Minocyclin	-----	20	10	5,0 ..	mcg/ml Testreihe
		15	7,5		mcg/ml Kontrolltestreihe
Tetracyclin	-----	20	10	5,0 ..	mcg/ml Testreihe
		15	7,5		mcg/ml Kontrolltestreihe
Doxycyclin	-----	40	20	10,0 ..	mcg/ml Testreihe
		30	15		mcg/ml Kontrolltestreihe

Das 10. Röhrchen diente jeweils zur Kontrolle und enthielt 1 ml sterile Pufferlösung und 1 ml Inoculum. Nach einer Bebrütung von 18 Stunden bei 37° Celsius wurde der Test so abgelesen, daß die kleinste Konzentration an Antibiotika, die zu einer vollkommenen Hemmung des Bakterienwachstums in den Röhrchen führte, als minimale Hemmkonzentration galt, also die Konzentration, die sich im letzten Röhrchen befand, dessen Inhalt mit bloßem Auge noch als klar erkannt wurde.

II. Durchführung des Blättchentests

1. Untersuchungsmaterial

Es wurden dieselben Erregerstämme der Gattung *Escherichia Coli* verwendet wie für den Reihenverdünungstest, siehe Seite 8.

2. Verwendete Nährböden

Als Standardnährboden diente Difco Agar Antibiotic Med 1 mit folgender Zusammensetzung:

Bacto Beaf extr.	1,5
Bacto Yeast extr.	3,0
Casitone	4
Peptone	6
Dextrose	1
Badto Agar	15
pH 6,6 bei 25° Celsius	

3. Verwendete Disks (Testblättchen)

Zum Einsatz gelangten Monodisks mit einer Beschickung von 30 mcg bei Doxycyclin und Minocyclin, mit einer Beschickung von 20 mcg bei Tetracyclinhydrochlorid - wie im Handel erhältlich.

4. Ausführung

Der Agar wurde täglich in Petrischalen von 8,5 cm Durchmesser bis zu einer Agardicke von 4 mm frisch ausgegossen und bei +4° Celsius zum Erstarren gebracht. Danach wurden die Agarschalen 30 Minuten lang im Brutschrank getrocknet, bis die Oberfläche spiegelnd trocken war, siehe recommendations by Ericsson und Sherris (1). Mit einer Öse wurden 3 Tropfen des Inoculums auf die Agarplatten gebracht und mit einem Drygalsky-Spatel vorsichtig gleichmäßig verstrichen.

Pro Test wurden drei Blättchen aufgelegt und mit einer Pinzette leicht an den Agar gepreßt. Hierauf wurden die Platten bei 37° Celsius 18 Stunden lang bebrütet. In Versuchen zeigte es sich, daß eine Prädiffusion von 30 Minuten bei Raumtemperatur keinen Einfluß auf die Hemmzonen hatte.

Die Ablesung der Hemmzone erfolgte mit Hilfe eines Stechzirkels. Eine vereinzelt auftretende Kolonie innerhalb der Hemmhofzone wurde ignoriert, traten mehrere Kolonien vereinzelt auf, wurde der Test verworfen und neu angesetzt.

D. VERSUCHE MIT MINOCYCLIN

I. Ergebnisse im Reihenverdünnungstest

Legende zu Tabelle 1 und 2

Die Ergebnisse der Messungen im Reihenverdünnungstest für Minocyclin sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt. Es wurden zwei Reihenverdünnungstest-Messungen zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration im Abstand von wenigen Tagen mit demselben Bakterienstamm durchgeführt. Jede Einzelmessung wurde gleichzeitig durch eine parallellaufende Kontrollmessung bestätigt. Den jeweils im 1. und 2. Reihenverdünnungstest gefundenen minimalen Hemmkonzentrationen sind die Ergebnisse des Blättchentests gegenübergestellt.

II. Ergebnisse im Disktest (Blättchentest)

Legende zu Tabelle 1 und 2

Parallel zu der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration eines Bakterienstammes in 2 Reihenverdünnungstests wurde die Hemmhofgröße (HH) im Blättchentest gemessen. Bei jeder Messung wurden drei Monodisks aufgelegt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und 2 aufgeführt. In der rechten Spalte der Tabellen 1 und 2 sind als Ergebnisse jeweils die Mittelwerte aus beiden Testarten zusammengefaßt und einander gegenübergestellt. Die Blättchenbeschickung war 30 mcg.

III. Zusammenhang zwischen Reihenverdünnungstest und Blättchentest

Legende zu Abbildung 1

In Abbildung 1 ist der Zusammenhang zwischen den Ergebnissen aus Reihenverdünnungstest und Blättchentest in der Regressionsgeraden für Minocyclin graphisch dargestellt. Die im Reihenverdünnungstest gefundene minimale Hemmkonzentration ist der bisher genaueste Meßparameter für die Sensibilitätstestung eines Bakterienstammes und dient als Bezugsgröße für die Hemmhofgrößen des Blättchentests.

Wenn man 3,5 mcg/ml als den Blutspiegelwert betrachtet, der durch therapeutische Minocyclingaben noch erreicht werden kann,

ist ein Hemmhofdurchmesser von 16 mm geeignet, in vitro zwischen minocyclin-empfindlichen und minocyclin-resistenten Bakterienstämmen zu unterscheiden. In Abbildung 1 ist diese Grenze durch rote Linien gekennzeichnet. Unser Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung etwa mit Untersuchungen, die von Klastersky und Daneau (5) durchgeführt wurden. Die Hemmhofzonen, die Frisk und Tunevall (6) angeben, um zwischen Stämmen zu unterscheiden, die resistent oder empfindlich gegenüber 3 mcg/ml Minocyclin waren, sind jedoch größer.

Im Bereich der minocyclin-empfindlichen Stämme ist eine deutliche weitere Aufschlüsselung zu erkennen. Bakterienpopulationen, deren minimale Hemmkonzentrationen zwischen 0,93 bis 2,5 mcg/ml liegen, zeigen Hemmhofzonen zwischen 19 und 15 mm. Eine weitere Gruppe von Bakterienstämmen hat minimale Hemmkonzentrationen für Minocyclin von 0,1 bis 0,9 mcg/ml, siehe dazu Abbildung 1. Stämme, deren Minocyclin-Empfindlichkeit bei 0,1 mcg/ml und darunter liegt, haben Hemmhofwerte von 22 mm und mehr. Auch im Bereich der minocyclin-resistenten Stämme ist eine noch deutliche Abhängigkeit zwischen der minimalen Hemmkonzentration eines Stammes und seiner Hemmhofgröße festzustellen. Für die ganze Kurve ist eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus 2 der minimalen Hemmkonzentrationen und den Hemmhofzonen der getesteten Bakterien zu erkennen.

Die Regressionskurve, die mit Hilfe der Tests hier aufgestellt wurde, zeigt also einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des Reihenverdünnungstests und denen des Agardiffusionstests, ist aber ungeeignet für eine exakte Bestimmung der MIC eines Keimes aufgrund seines Hemmzonendurchmessers.

In dem von mir deshalb aufgestellten Test Diagramm Abb. 1a wird versucht, für die Hemmzonendurchmesser Hemmbereiche aufzustellen, die den minimalen Hemmkonzentrationen der jeweiligen Keime entsprechen, so daß für die Praxis eine genauere Festlegung der MIC eines Keimes anhand seines Hemmzonendurchmessers möglich wird. Die schwarz schraffierten Felder in Abb. 1a entsprechen dabei den MIC's, die am häufigsten für einen bestimmten Hemmhofdurchmesser gefunden wurden, die weißen Flächen beziehen die seltener vorkommenden Meßergebnisse mit ein, berücksichtigen also die Streu-

breite der Meßergebnisse.

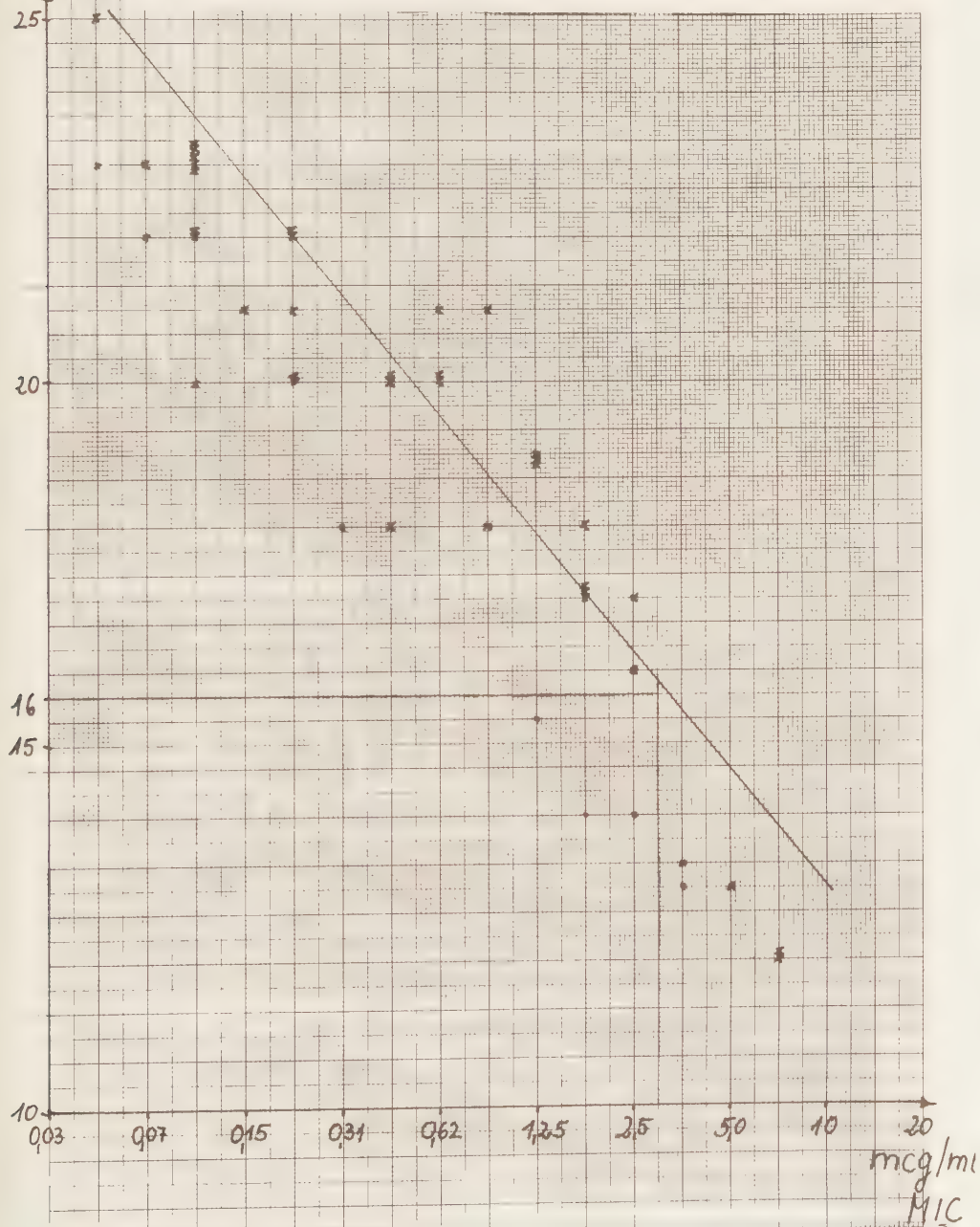
An einem Beispiel soll die Benutzung der Test Diagramme genauer erläutert werden:

Der Mittelwert aus den drei erhaltenen Hemmhofwerten 21 mm, 21 mm und 22 mm ist 21 mm und muß mit den schwarz schraffierten Feldern in Abb. 1a in Übereinstimmung gebracht werden. Die dazugehörige MIC liegt zwischen 0,15 und 0,9 mcg/ml. Berücksichtigt man nun, daß bei den Einzelmessungen einer der Hemmhofwerte bei 22 mm lag, was einem Hemmbereich zwischen 0,15 und 0,31 mcg/ml entspräche, kann die zu diesen Hemmhofwerten zugehörige MIC des Keimes bei 0,31 mcg/ml festgelegt werden.

HH

mm

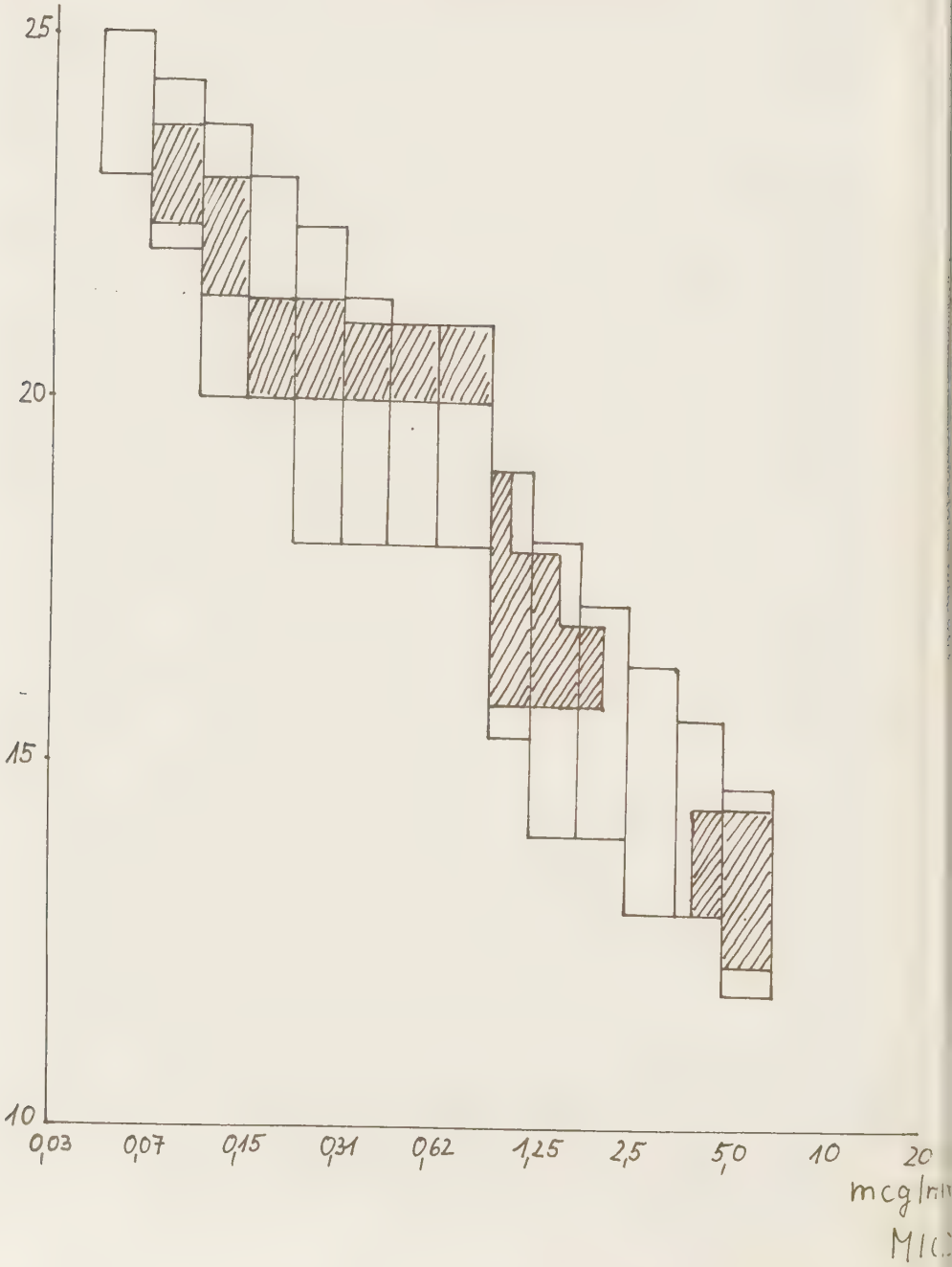
Abb. 1 Regressionsgerade für Minocyclin mit 50 E.coli Stämmen



HH

mm

Abb. 1a Test Diagramm für Minocyclin



Testergebnisse beim Minocyclintest

Tabelle 1

Stamm	1. Test				2. Test				Mittelwerte	
	M I C (mcg/ml)	HH bei 30 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH bei 30 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH (mm)
EC 1	7,5	9	9	8	7,5	9	10	9	7,5	9
EC 2	0,31	20	21	20	0,46	18	19	20	0,46	20
EC 3	0,06	25	25	25	0,03	26	25	25	0,06	25
EC 4	0,12	20	20	20	0,12	20	20	20	0,12	20
EC 5	25,	17	17	17	1,87	17	17	17	2,5	17
EC 6	0,46	18	19	18	0,46	18	19	18	0,46	18
EC 7	0,15	21	20	21	0,15	21	21	22	0,15	21
EC 8	1,87	18	17	18	1,87	18	18	18	1,87	18
EC 9	7,5	12	11	12	7,5	11	12	13	7,5	12
EC 10	0,62	20	19	20	0,62	20	20	21	0,62	20
EC 11	1,87	17	18	18	1,87	15	16	16	1,87	17
EC 12	1,25	19	20	19	1,25	18	17	19	1,25	19
EC 13	0,62	21	20	21	0,62	22	22	23	0,62	21
EC 14	0,23	22	22	23	0,23	21	20	19	0,23	21
EC 16	0,12	23	24	24	0,12	23	23	23	0,12	23
EC 17	0,12	24	22	21	0,12	22	22	22	0,12	22
EC 18	0,62	19	19	20	0,62	20	20	20	0,62	20
EC 19	0,07	23	24	25	0,07	20	22	23	0,07	23
EC 20	0,23	22	23	25	0,23	19	21	22	0,23	22
EC 21	7,5	12	11	10	7,5	12	12	13	7,5	12
EC 22	0,23	22	24	25	0,23	22	21	20	0,23	22
EC 23	2,5	16	16	15	2,5	16	16	17	2,5	16

Tabelle 2

Stamm	1. Test				2. Test				Mittelwerte	
	M I C (mcg/ml)	HH bei 30 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH bei 30 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH (mm)
EC 24	5,0	10	11	11	7,5	10	10	10	7,5	10
EC 25	0,07	24	24	24	0,23	21	21	21		
EC 26	0,07	22	23	24	0,07	22	23	19	0,07	22
EC 27	0,12	23	23	23	0,12	23	22	22	0,12	23
EC 28	1,25	19	17	18	0,62	19	20	19	1,25	19
EC 29	1,87	17	17	16	1,87	17	17	17	1,87	17
EC 30	0,12	23	24	25	0,12	23	23	22	0,12	23
EC 31	1,87	17	17	17	1,25	17	17	17	1,87	17
EC 32	20,0	6	6	6	20,0	6	6	6	20,0	6
EC 33	5,0	13	13	11	5,0	13	13	14	5,0	13
EC 34	0,93	18	18	18	0,93	18	17	18	0,93	18
EC 35	2,5	14	13	14	2,5	14	14	14	2,5	14
EC 36	3,75	13	14	13	3,75	13	13	13	3,75	13
EC 37	1,25	15	14	14	1,25	15	15	15	1,25	15
EC 38	0,31	20	21	20	0,12	22	22	23		
EC 39	1,87	16	15	16	3,75	12	12	13		
EC 40	0,06	23	24	24	0,06	21	23	23	0,06	23
EC 41	3,75	13	13	13	3,75	12	13	13	3,75	13
EC 42	1,25	14	14	14	1,87	14	14	14	1,87	14
EC 43	15,0	6	6	6	15,0	6	6	6	15,0 μ	6
EC 44	0,07	22	22	22	0,07	22	22	21	0,07	22
EC 45	0,23	20	20	20	0,23	20	20	20	0,23	20
EC 46	0,31	18	18	18	0,31	18	19	19	0,31	18
EC 47	0,93	21	21	21	0,93	21	21	20	0,93	21
EC 48	1,25	19	19	19	1,25	19	19	19	1,25	19
EC 49	0,23	20	20	20	0,23	20	20	21	0,23	20
EC 50	0,46	20	20	20	0,46	20	20	20	0,46	20

E. VERSUCHE MIT TETRACYCLINHYDROCHLORID

I. Ergebnisse im Reihenverdünnungstest

Wie bei der Untersuchung mit Minocyclin wurde auch bei der Messung mit Tetracyclinhydrochlorid (Achromycin) der Reihenverdünnungstest im Abstand von mehreren Tagen zweimal durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und 4 angegeben.

Wie aus Tabelle 3 und 4 ersichtlich, zeigte sich zwischen den Ergebnissen der beiden Reihenverdünnungstestungen weitgehende Übereinstimmung, sodaß die gefundene minimale Hemmkonzentration als relativ genauer Parameter für die Empfindlichkeit des Bakterienstammes gelten kann.

II. Ergebnisse im Disktest (Blättchentest)

Legende zu Tabelle 3 und 4

Parallel zu der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration in den Reihenverdünnungstests wurde wieder die Hemmhofgröße (HH) der jeweiligen Bakterienstämme gemessen. Dabei wurde der Blättchentest auf dieselbe Weise durchgeführt wie für Minocyclin und die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und 4 aufgeführt.

III. Zusammenhang zwischen Reihenverdünnungstest und Blättchentest

Legende zu Abbildung 2

In der rechten Spalte der Tabellen 3 und 4 sind die Mittelwerte aus beiden Testarten zusammengefaßt und einander gegenübergestellt.

In Abbildung 2 - Untersuchungen mit Tetracyclinhydrochlorid - sind die Ergebnisse beider Tests, Blättchentest und Reihenverdünnungstest, graphisch dargestellt und zueinander in Beziehung gesetzt. Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, daß die Grenze der in vitro tetracyclinempfindlichen Bakterienstämme und der tetracyclin-resistenten Bakterienstämme bei 19 mm Hemmhofgröße liegt.

Die minimale Hemmkonzentration der tetracyclinempfindlichen Bakterienpopulationen beträgt entsprechend 3 mcg/ml und weniger. Wir verweisen auf Untersuchungen von Bauer u. al. (22), der mit den handelsüblichen Blättchen, imprägniert mit 20 mcg/ml Tetracyclin

bei einer minimalen Hemmkonzentration von 12 mcg/ml als Grenze in vitro zwischen tetracyclin-resistenten und tetracyclin-empfindlichen Bakterienstämmen einen entsprechenden Hemmhofdurchmesser von 19 mm bestimmt hatte. Dies deckt sich in etwa auch mit Untersuchungen von Klastersky und Daneau (5). Darüber hinaus haben diese durch Anhebung des pH Wertes im Reihenverdünnungstest auf 5,0 erreicht, daß fast alle tetracyclin-empfindlichen Bakterienstämme schon bei einer Konzentration von 3 mcg/ml in vitro inhibiert wurden. Bei dem von uns aus durchgeführten Reihenverdünnungstest mit Verwendung eines Phosphatpuffers von pH 4,5 zeigte es sich, daß eine scharfe Trennung zwischen tetracyclin-empfindlichen und tetracyclin-resistenten Stämmen schon bei 3 mcg/ml entstand und eine Erhöhung der Tetracyclindosis auf über 20 mcg/ml keine weitere inhibitorische Effektivität mehr erzeugte.

In Abbildung 2 ist die Grenze zwischen den in vitro tetracyclin-empfindlichen Bakterienstämmen und den tetracyclin-resistenten Populationen durch rote Linien gekennzeichnet. Berücksichtigt werden dabei die auch in vivo erreichbaren therapeutischen Blutspiegelwerte.

Auch hier ist im Bereich der tetracyclin-empfindlichen Bakterienstämme eine weitere Aufschlüsselung erkennbar. Bakterienpopulationen, deren minimale Hemmkonzentration etwa zwischen 1,9 und 3,0 mcg/ml liegen, zeigen Hemmhofzonen zwischen 20 und 25 mm. Bakterienstämme, deren minimale Hemmhofkonzentrationen zwischen 0,9 und 1,0 mcg/ml betragen, haben Hemmhofzonen von 26 bis 28 mm.

Sehr tetracyclin-empfindliche Bakterienstämme, deren minimale Hemmkonzentration kleiner als 0,9 mcg/ml ist, zeigen Hemmhofwerte von 28 mm und mehr.

Auch hier kann jedoch die Regressionsgerade in Abb. 2 nur dazu dienen, einen generellen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen im Reihenverdünnungstest und Agardiffusionstest zu demonstrieren. Für eine genauere Korrelierung der Ergebnisse im Reihenverdünnungstest mit den Ergebnissen des Agardiffusionstest ist sie ungeeignet und es wurde deshalb analog zu den Versuchsergebnissen mit Minocyclin auch hier ein Test Diagramm aufgestellt - S. Abb. 2a, das eine genaue Festlegung der MIC eines Keimes anhand seines Hemmzonendurchmessers ermöglicht. Die Benutzung des Test Diagramms ist analog zu dem Test Diagramm von Minocyclin s. S.13.

Abb.2 Regressionsgerade für Tetracyclin mit 50 E.coli Stämmen

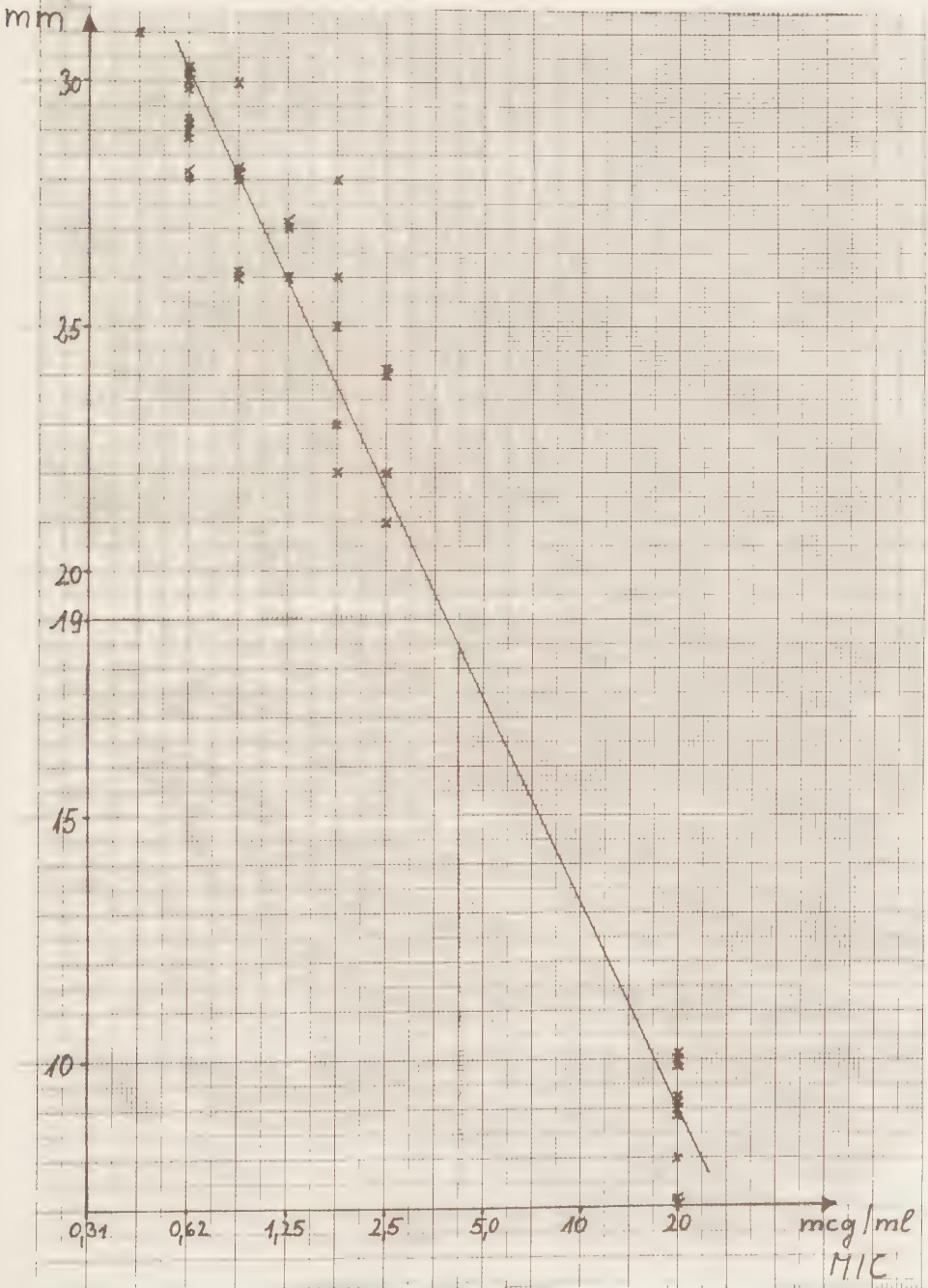
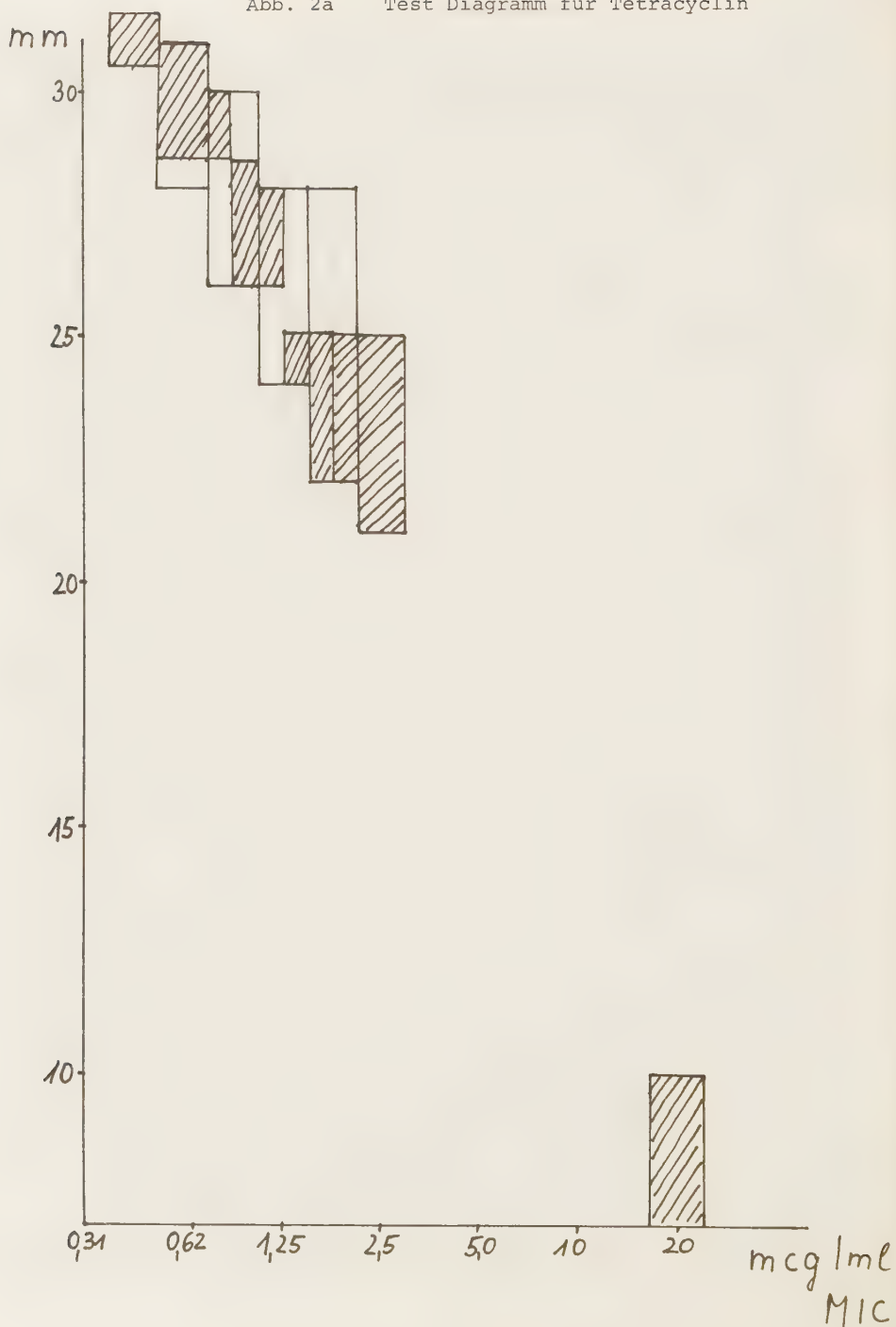


Abb. 2a Test Diagramm für Tetracyclin



Testergebnisse beim Tetracyclinhydrochloridtest

Tabelle 3

Stamm	1. Test				2. Test				Mittelwerte	
	M I C (mcg/ml)	HH bei 20 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH bei 20 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH (mm)
EC 1	20,0	0	0	0	20,0	0	0	0	20,0	0
EC 2	1,25	27	27	27	1,25	27	27	27	1,25	27
EC 3	0,62	28	29	30	0,62	28	28	26	0,62	29
EC 4	0,62	29	29	29	0,62	29	28	29	0,62	29
EC 5	20,0	7	7	7	20,0	7	7	7	20,0	7
EC 6	0,62	28	28	28	0,62	28	28	28	0,62	28
EC 7	20,0	7	7	8	20,0	7	7	7	20,0	7
EC 8	0,93	28	27	28	0,93	28	27	28	0,93	28
EC 9	20,0	0	0	0	20,0	0	0	0	20,0	0
EC 10	20,0	0	0	0	20,0	0	0	0	20,0	0
EC 11	20,0	9	9	10	20,0	9	9	9	20,0	9
EC 12	20,0	10	10	10	20,0	10	12	10	20,0	10
EC 13	1,87	28	28	28	1,87	28	28	28	1,87	28
EC 14	0,93	30	30	30	0,62	30	30	30	0,93	30
EC 15	1,25	26	26	25	1,25	26	26	26	1,25	26
EC 16	0,93	26	26	26	0,93	26	26	26	0,93	26
EC 17	20,0	0	0	0	20,0	0	0	0	20,0	0
EC 18	2,5	24	24	23	2,5	24	24	23	2,5	24
EC 19	0,62	28	28	28	0,62	28	28	28	0,62	28
EC 20	0,62	30	30	30	0,62	30	30	30	0,62	30
EC 21	20,0	0	0	0	20,0	0	0	0	20,0	0
EC 22	1,87	26	26	27	1,87	26	26	25	1,87	26
EC 23	1,25	27	27	27	1,25	27	27	27	1,25	27
EC 24	20,0	0	0	0	20,0	0	0	0	20,0	0

Tabelle 4

Stamm	1. Test				2. Test				Mittelwerte	
	M I C (mcg/ml)	HH bei 20 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH bei 20 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH (mm)
EC 25	0,62	29	30	29	0,62	29	29	29	0,62	29
EC 26	0,62	30	30	30	0,46	30	30	30	0,62	30
EC 27	0,93	28	28	28	0,93	28	28	28	0,93	28
EC 28	0,62	30	29	30	0,62	30	20	29	0,62	30
EC 29	20,0	10	9	9	20,0	10	10	10	20,0	10
EC 30	0,93	28	27	28	0,93	28	28	28	0,93	28
EC 31	20,0	10	9	10	20,0	10	9	10	20,0	10
EC 32	20,0	0	0	0	20,0	0	0	0	20,0	0
EC 33	1,25	26	27	26	0,46	30	30	30		
EC 34	20,0	9	9	9	20,0	9	9	9	20,0	9
EC 35	0,93	26	26	26	0,93	26	26	26	0,93	26
EC 36	20,0	0	0	0	20,0	0	0	0	20,0	0
EC 37	20,0	9	9	9	20,0	9	9	10	20,0	9
EC 38	1,87	22	22	22	1,87	22	22	22	1,87	22
EC 39	2,5	24	24	24	2,5	24	24	24	2,5	24
EC 40	0,62	30	30	30	0,62	30	30	30	0,62	30
EC 41	1,87	23	23	23	1,87	23	23	23	1,87	23
EC 42	20,0	0	0	0	20,0	0	0	0	20,0	0
EC 43	0,46	31	31	31	0,46	31	31	31	0,46	31
EC 44	0,62	29	29	29	0,46	29	29	29	0,62	29
EC 45	1,87	25	25	25	1,87	25	25	25	1,87	25
EC 46	20,0	8	8	8	20,0	8	8	8	20,0	8
EC 47	2,5	22	22	22	2,5	22	22	22	2,5	22
EC 48	20,0	0	0	0	20,0	0	0	0	20,0	0
EC 49	1,87	21	22	23	2,5	21	21	21	2,5	21
EC 50	20,0	9	9	9	20,0	9	9	9	20,0	9

F. VERSUCHE MIT DOXYCYCLIN

I. Ergebnisse im Reihenverdünnungstest

Legende zu Tabelle 4 und 5

Als letzte der drei Wirkstoffsubstanzen der Tetrazyklinreihe wurde Doxycyclin verwendet. Wieder wurde bei 50 Bakterienstämmen (E.Coli) die minimale Hemmkonzentration, diesmal für Doxycyclin, im Reihenverdünnungstest bestimmt. Auch hier wurde der Reihenverdünnungstest im Abstand von mehreren Tagen zweimal durchgeführt. In Tabelle 4 und 5 sind die Ergebnisse beider Messungen aufgezeichnet. In der rechten Spalte ist der Mittelwert aus beiden Messungen angegeben.

II. Ergebnisse im Disktest (Blättchentest)

Legende zu Tabelle 4 und 5

In der linken Spalte der Tabellen 4 und 5 sind zu den im Reihenverdünnungstest gemessenen minimalen Hemmkonzentrationen die zugehörigen Hemmhofzonen aufgeführt. In der rechten Spalte sind die Mittelwerte aus den gemessenen Hemmhofzonen angegeben. Die Testungen wurden in der gleichen Weise durchgeführt wie für Minocyclin und Tetracyclinhydrochlorid. Die Blättchenbeschickung war 30 mcg/ml.

III. Zusammenhang zwischen Reihenverdünnungstest und Blättchentest

Legende zu Abbildung 3

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse beider Tests mit Doxycyclin graphisch in einer Regressionsgeraden dargestellt. Berücksichtigt man den durch therapeutische Doxycyclingaben erreichten Blutspiegelwert von etwa 6 bis 7 mcg/ml als Parameter für die Unterscheidung zwischen doxycyclin-empfindlichen und doxycyclin-resistenten Bakterienstämmen, so entspricht das in etwa einer in vitro bestimmten minimalen Hemmkonzentration von 3,75 mcg/ml. Der dazugehörige Hemmhofdurchmesser war 18 mm.

Im Bereich der doxycyclin-empfindlichen Stämme ist eine weitere Auf-

schlüsselung zu erkennen. Bakterienpopulationen, deren minimale Hemmkonzentrationen zwischen 3,75 und 2,5 mcg/ml liegen, zeigen Hemmhofzonen zwischen 18 und 20 mm. Finden sich die minimalen Hemmhofkonzentrationen für Doxycyclin im Bereich von 1,9 bis 0,6 mcg/ml, werden Hemmhofzonen zwischen 22 und 26 mm gemessen.

Minimalen Hemmkonzentrationen von 0,46 mcg/ml und weniger entsprechen Hemmhofzonen von 26 mm und mehr.

Auch im Bereich der doxycyclin-resistenten Bakterienpopulationen sind deutliche Abgrenzungen sichtbar. Stämme, deren minimale Hemmkonzentration bei 7,5 und 10 mcg/ml liegt, zeigen Hemmhofzonen zwischen 15 und 12 mm. Bei minimalen Hemmkonzentrationen von 15 und mehr mcg/ml sind die Hemmhofwerte 12 mm und kleiner.

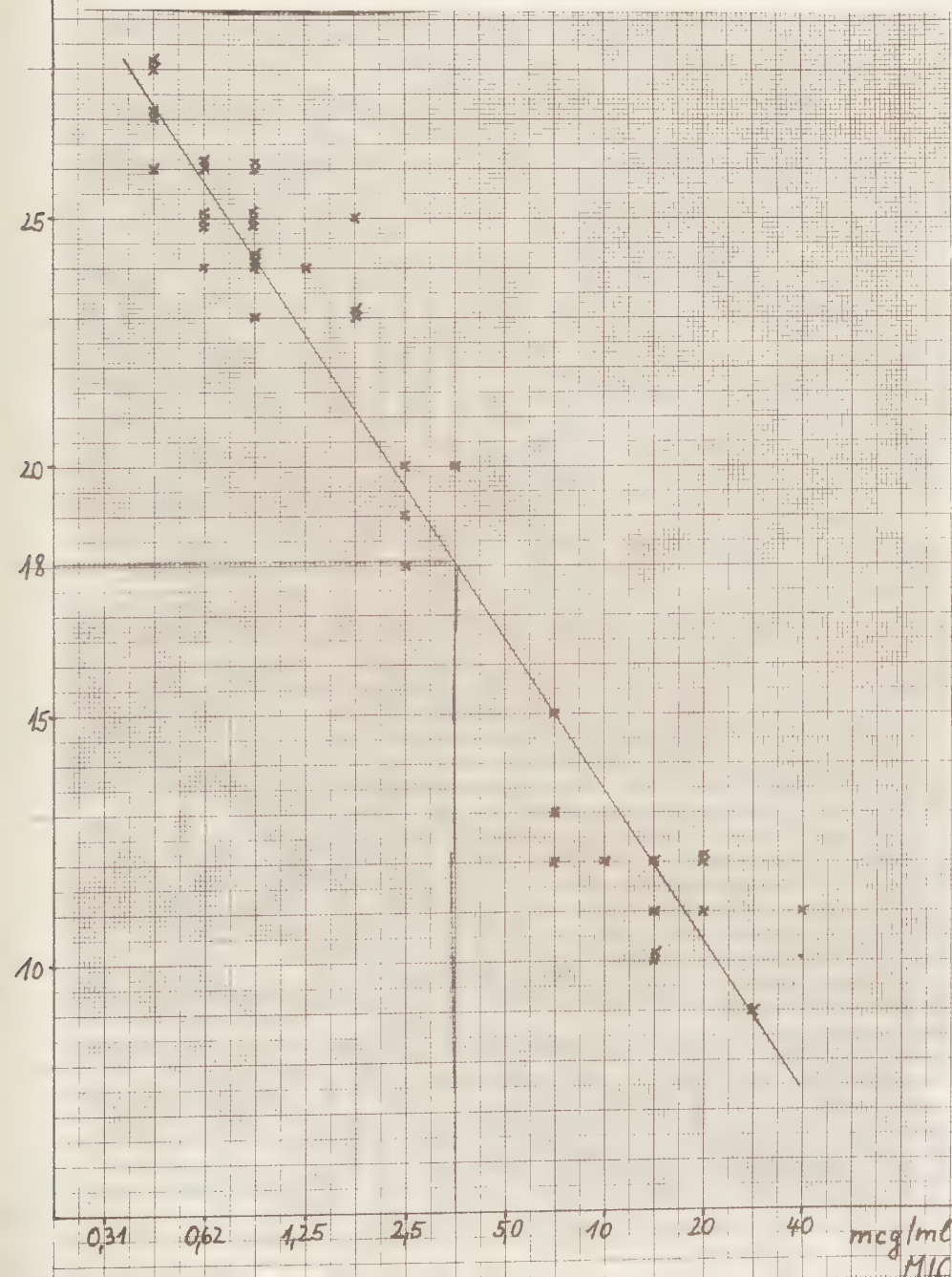
Auch hier wurde zur besseren Verwertung der Testergebnisse ein Test Diagramm aufgestellt - s. Abb. 3a, das eine genauere Bestimmung der MIC anhand der Hemmzonendurchmesser eines Keimes ermöglicht, als es durch die Regressionsgerade in Abb. 3 gegeben ist.

HH

mm
30

27

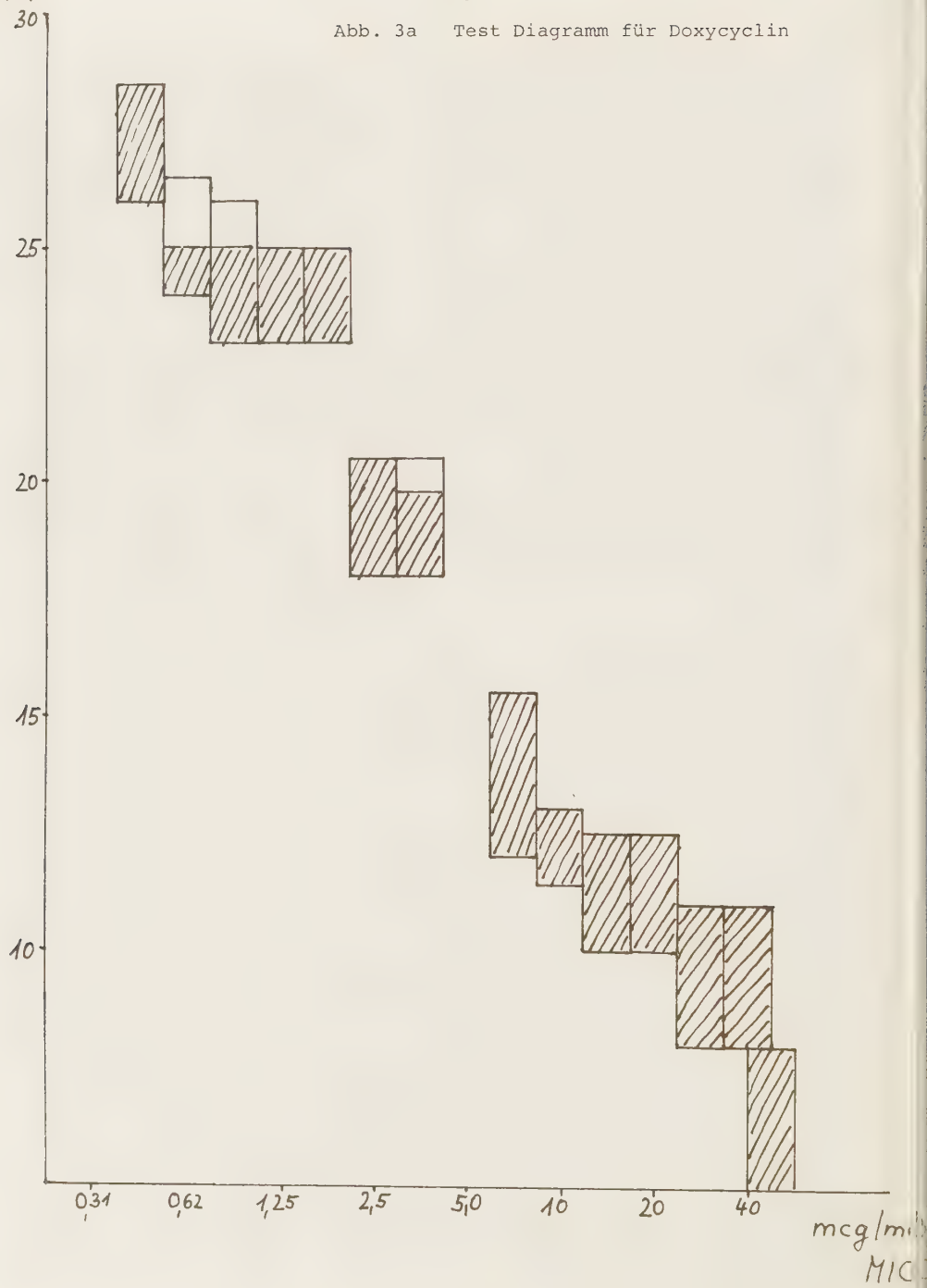
Abb. 3 Regressionsgerade für Doxycyclin mit 50 E.coli Stämmen



HH
mm

28

Abb. 3a Test Diagramm für Doxycyclin



Testergebnisse beim Doxycyclintest
Tabelle 5

Stamm	1. Test				2. Test				Mittelwerte	
	M I C (mcg/ml)	HH bei 30 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH bei 30 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH (mm)
EC 1	40,0	0	0	0	40,0	0	0	0	40,0	0
EC 2	1,87	18	18	19	2,5	18	18	18	2,5	18
EC 3	0,93	23	23	23	0,93	23	23	23	0,93	23
EC 4	0,62	24	24	25	0,62	24	24	24	0,62	24
EC 5	30,0	9	9	9	30,0	9	9	9	30,0	9
EC 6	0,62	26	27	26	0,62	26	26	26	0,62	26
EC 7	0,93	25	24	25	0,62	25	25	25	0,92	25
EC 8	20,0	12	11	12	20,0	12	12	12	20,0	12
EC 9	40,0	0	0	0	40,0	0	0	0	40,0	0
EC 10	40,0	0	0	0	40,0	0	0	0	40,0	0
EC 11	20,0	11	10	11	20,0	11	11	11	20,0	11
EC 12	20,0	12	13	12	20,0	12	12	12	20,0	12
EC 13	1,25	23	24	25	1,87	23	23	23	1,87	23
EC 14	1,87	25	25	26	1,25	25	25	25	1,87	25
EC 15	0,46	28	28	28	0,46	28	27	28	0,46	28
EC 16	0,93	26	25	26	0,93	26	26	26	0,93	26
EC 17	0,62	25	24	25	0,62	25	25	24	0,62	25
EC 18	0,62	25	25	25	0,62	25	25	25	0,62	25
EC 19	0,46	26	26	26	0,46	26	27	27	0,46	26
EC 20	0,62	25	25	26	0,93	25	25	26	0,93	25
EC 21	40,0	0	0	0	40,0	0	0	0	40,0	0
EC 22	0,93	24	24	26	0,93	24	23	24	0,93	24
EC 23	0,93	24	24	24	0,93	24	25	24	0,93	24
EC 24	40,0	0	0	0	40,0	0	0	0	40,0	0

Tabelle 6

Stamm	1. Test				2. Test				Mittelwerte	
	M I C (mcg/ml)	HH bei 30 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH bei 30 mcg (mm)			M I C (mcg/ml)	HH (mm)
EC 25	0,62	26	26	27	0,93	26	24	23	0,93	26
EC 26	0,93	24	25	24	0,62	24	24	23	0,93	24
EC 27	0,62	26	27	28	0,62	26	26	25	0,62	26
EC 28	0,93	25	26	25	0,93	25	25	25	0,93	25
EC 29	15,0	12	12	12	15,0	12	13	12	15,0	12
EC 30	0,62	25	25	25	0,62	25	25	25	0,62	25
EC 31	0,46	27	26	27	0,46	27	27	26	0,46	27
EC 32	40,0	0	0	0	40,0	0	0	0	40,0	0
EC 33	7,5	12	13	12	10,0	12	12	12	10,0	12
EC 34	7,5	13	13	13	7,5	13	13	13	7,5	13
EC 35	40,0	0	0	0	40,0	0	0	0	40,0	0
EC 36	15,0	10	10	10	15,0	10	10	10	15,0	10
EC 37	15,0	11	10	11	15,0	11	11	11	15,0	11
EC 38	2,5	19	19	20	2,5	19	19	19	2,5	19
EC 39	15,0	11	11	12	15,0	11	11	12	15,0	11
EC 40	40,0	11	11	10	40,0	11	11	11	40,0	11
EC 41	3,75	20	20	21	3,75	20	20	21	3,75	20
EC 42	40,0	0	0	0	40,0	0	0	0	40,0	0
EC 43	0,46	27	27	28	0,46	27	27	27	0,46	27
EC 44	40,0	0	0	0	40,0	0	0	0	40,0	0
EC 45	7,5	12	12	12	7,5	12	12	12	7,5	12
EC 46	7,5	15	15	15	7,5	15	15	15	7,5	15
EC 47	2,5	20	20	21	2,5	20	20	20	2,5	20
EC 48	1,25	24	24	25	1,25	24	24	24	1,25	24
EC 49	1,87	23	23	23	1,87	23	23	23	1,87	23
EC 50	0,46	28	27	26	0,46	28	28	28	0,46	28

G. KRITISCHE BETRACHTUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

I. Diskussion der Ergebnisse mit Minocyclin

1. Reihenverdünnungstest - Meßwertdifferenzen als mögliche Fehlerquellen

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration eines Bakterienstammes zur Feststellung seines Empfindlichkeitsgrades gegenüber Minocyclin wurde zweimal im Abstand von wenigen Tagen durchgeführt, um mögliche Fehlerquellen dieser Meßmethode zu kontrollieren und ihre Reproduzierbarkeit zu erfassen. Es zeigten sich dabei folgende Meßwertdifferenzen in den minimalen Hemmkonzentrationen der Reihenverdünnungstests, die für die Beurteilung der Ergebnisse mit zu berücksichtigen sind:

Minimaler Hemmkonzentrations-Unterschied zwischen

1. und 2. Messung

Kein Unterschied	40 Keime	80 %
Unterschied um 1/2 Verdünnungsschritt	6 Keime	12 %
Unterschied um 1 Verdünnungsschritt	2 Keime	4 %

Unterschied von mehr als einem Verdünnungsschritt zeigte sich bei 2 Keimen. Sie zeigten bei der 2. Messung auch einen entsprechend geringeren Hemmhof im Disktest (Blättchentest).

Von den fünfzig untersuchten Bakterienstämmen wurden alle von Minocyclin ab 20 mcg/ml gehemmt. Die Empfindlichkeit war innerhalb der angewendeten Konzentrationen gut aufgefächert. Bezogen auf den Blutspiegelwert von 3,5 mcg/ml, der mit üblichen therapeutischen Dosen erreicht wird, blieben nur 9 Keime oberhalb dieser Grenze, die einer in vitro gemessenen minimalen Hemmkonzentration von etwa 1,8 mcg/ml entspricht:

Anzahl der getesteten Keime	% der getesteten Keime	MIC in mcg/ml	Keime
10	20%	2,5 u. höher	resistent
14	28%	1,81 bis 0,9	empfindlich
21	42%	0,9 bis 0,12	gut empfindlich
5	10%	kleiner als 0,12	sehr empfindlich

2. Blättchentest-Meßwertdifferenzen als mögliche Fehlerquellen

Für die Messung der Hemmhofgröße wurden Monodisks der Firma Oxoid GmbH Limited, London, mit einer Beschickung von 30 mcg/ml pro Blättchen verwendet. Bei jedem Keim wurde durchschnittlich 6 bis 9 mal die Hemmhofgröße bestimmt und der für diesen Keim im Reihenverdünnungstest ermittelten minimalen Hemmkonzentration zugeordnet.

Wie aus Tabelle 1 bis 4 ersichtlich, ergaben sich Abweichungen in der Hemmhofgröße bei Mehrfachmessungen eines Keimes, so daß ein Mittelwert gefunden werden mußte:

Hemmhofabweichungen vom Mittelwert bei Mehrfachmessung eines Keimes

Kein Unterschied	12 Keime	24%	) = 72%
Abweichung bis zu $\pm$ 1mm vom Mittelwert	24 Keime	48%	
Abweichung bis zu $\pm$ 2mm vom Mittelwert	9 Keime	18%	
Abweichung bis zu $\pm$ 3mm vom Mittelwert	5 Keime	10%	

Die Mittelwerte der Hemmhofgrößen für verschiedene Keime derselben Empfindlichkeit gegenüber Minocyclin sind in Abbildung 1 auf

der Ordinate eingezeichnet. Hierbei ist deutlich zu erkennen, daß eine lineare Beziehung zwischen Hemmhofgröße und minimaler Hemmkonzentration besteht, daß jedoch infolge der geringen Steigung der Geraden (Beziehung zwischen Hemmhofgröße und minimaler Hemmkonzentration) besonders im Empfindlichkeitsbereich 0,9 bis 0,12 mcg/ml und der im Verhältnis dazu großen Schwankungsbreite der Hemmhöfe eine genauere Zuordnung eines bestimmten Hemmhofwertes zu der entsprechenden minimalen Hemmkonzentration nur unter Vorbehalten möglich ist. Dagegen läßt sich eine gröbere Einteilung in Empfindlichkeitsbereiche leichter durchführen.

Einteilung der Hemmhöfe in Hemmkonzentrationsbereiche

Hemmhof	Minimale Hemmkonzentration mcg/ml	Keime
kleiner als 15 mm	3,5 und höher	resistent
16 bis 19 mm	zwischen 1,8 und 0,93	wenig empfindlich
20 bis 22 mm	zwischen 0,93 und 0,12	gut empfindlich
größer als 22 mm	0,12 und kleiner	sehr gut empfindlich

3. Diskussion der Kurve

Wie aus der Diskussion der Meßwerte im Reihenverdünnungstest ersichtlich, ist die Genauigkeit bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration im Reihenverdünnungstest relativ hoch. In Abbildung 1 ist nun die Hemmhofgröße auf der Ordinate eingezeichnet, die der minimalen Hemmkonzentration eines Bakterienstammes, auf der Abszisse eingezeichnet, entspricht. Hierbei zeigt es sich, daß verschiedene Bakterienstämme bei gleicher minimaler Hemmkonzentration Unterschiede in den Hemmhofzonen bis zu 5 mm aufweisen. Diese Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Hemmhofzonen erlaubt es nicht, wie schon bei der Diskussion des Disk-Tests (Blättchentest) ange-

deutet, eine endgültige Zuordnung eines bestimmten Hemmhofdurchmessers zu der Empfindlichkeit des Bakterienstammes vorzunehmen. Eine lineare Beziehung zwischen Hemmhofgröße und Logarithmus 2 der minimalen Hemmkonzentration einer Bakterienpopulation ist deutlich erkennbar. Die gleichzeitig relativ große Schwankungsbreite der Hemmhofwerte erlaubt jedoch nur eine Zuordnung bestimmter Hemmhofdurchmesser zu entsprechenden Empfindlichkeitsbereichen.

II. Diskussion der Ergebnisse bei Verwendung von Tetracyclinhydrochlorid als Wirkstoffsubstanz

1. Reihenverdünnungstest-Meßwertdifferenzen als mögliche Fehlerquellen

Die im Abstand von wenigen Tagen durchgeführte zweimalige Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration eines Bakterienstammes im Reihenverdünnungstest ergab folgende Meßwertdifferenzen:

Minimaler Hemmkonzentrations-Unterschied zwischen 1. und 2. Messung

Kein Unterschied	45 Keime	90%
Unterschied um 1/2 Verdünnungsschritt	4 Keime	8%

Bei einem Keim zeigte sich bei der 2. Messung eine Abweichung der minimalen Hemmkonzentration um mehr als einen Verdünnungsschritt. Es bestand hierbei auch eine entsprechende Hemmhofveränderung.

Die Empfindlichkeit der fünfzig getesteten Keime gegenüber Tetracyclinhydrochlorid war folgendermaßen aufgefächert, siehe auch Abbildung 2:

Anzahl der getesteten Keime	% der getesteten Keime	MIC in mcg/ml	Keime
20	40%	größer als 20 mcg/ml	resistent
12	24%	2,5 bis 1,25	empfindlich
18	36%	0,9 bis 0,4	sehr empfindlich

Es zeigte sich bei Tetracyclinhydrochlorid im Gegensatz zu Minocyclin hierbei ein deutlicher Abstand der Bakterienstämme zwischen solchen Stämmen, die bis zu einer minimalen Hemmkonzentration von

2,5 mcg/ml gehemmt werden konnten, also empfindlich waren, und einer anderen Gruppe, die sich auch bei hohen Konzentrationen resistent zeigten.

2. Blättchentest - Meßwertdifferenzen als mögliche Fehlerquellen

Für die Messung der Hemmhofgröße wurden Monodisks der Firma Oxoid GmbH Limited, London, mit einer Beschickung von 20 mcg/ml Tetracyclin pro Blättchen verwendet. Wie aus Tabelle 3 und 4 ersichtlich, ergaben sich Abweichungen in der Hemmhofgröße eines Keimes, sodaß ein Mittelwert gefunden werden mußte.

Der Grad der Abweichung war bei den fünfzig getesteten Keimen dabei folgendermaßen aufgeteilt:

Hemmhofabweichungen vom Mittelwert bei Mehrfachmessungen eines

Keimes

Kein Unterschied	32 Keime	66%
Abweichung bis zu ± 1 mm vom Mittelwert	14 Keime	28%
Abweichung bis zu ± 2 mm vom Mittelwert	3 Keime	6%

Die Beziehung zwischen den Hemmhofgrößen der verschiedenen Keime und ihrer im Reihenverdünnungstest ermittelten Empfindlichkeit (minimale Hemmkonzentration) ist in Abbildung 2 dargestellt.

Auch hier ist eine lineare Beziehung zwischen Hemmhofgröße und minimaler Hemmkonzentration eines Keimes ersichtlich, wobei jedoch wiederum die genaue Zuordnung einer bestimmten Hemmhofgröße zur minimalen Hemmkonzentration eines Keimes wegen der großen Schwankungsbreite des Hemmhofes nicht möglich ist. Dagegen kann auch hier eine Zuordnung von Hemmhofgröße zu einem bestimmten Empfindlichkeitsbereich vorgenommen werden:

Einteilung der Hemmhöfe in Hemmkonzentrationsbereiche

Hemmhof	Minimale Hemmkonzentration mcg/ml	Keime
10 mm und kleiner	20,0	resistent
zwischen 10 und 20 mm	zwischen 2,5 und 20,0	Ø Keime
20 bis 25 mm	zwischen 2,5 und 1,25	wenig empfindlich
26 bis 28 mm	zwischen 1,87 und 0,9	gut empfindlich
größer als 28 mm	0,93 und niedriger	sehr gut empfindlich

3. Diskussion der Kurve

In Abbildung 2 ist die Beziehung zwischen der minimalen Hemmkonzentration im Reihenverdünnungstest und der Hemmhofgröße im Blättchentest graphisch dargestellt. Hierbei ist das Fehlen von Bakterienstämmen mit minimalen Hemmkonzentrationen zwischen 3 mcg/ml und 20 mcg/ml besonders auffällig, sodaß im Bereich tetracyclin-resistenter Keime keine weitere Aufschlüsselung mehr möglich ist. Alle tetracyclin-resistenten Bakterienpopulationen zeigten minimale Hemmkonzentrationswerte von über 20 mcg/ml, die hier nicht weiter untersucht wurden. Auch in Abbildung 2 ist wiederum nur eine Zuordnung bestimmter Hemmhofdurchmesser zu entsprechenden Empfindlichkeitsbereichen möglich wegen der Schwankungsbreite der Hemmhofzonen verschiedener Bakterienstämme bei gleicher minimaler Hemmkonzentration; jedoch ist auch in Abbildung 2 eine lineare Beziehung zwischen Logarithmus 2 und der minimalen Hemmkonzentration eines Bakterienstammes und den Hemmhofdurchmessern erkennbar.

III. Diskussion der Ergebnisse bei Verwendung von Doxycyclin als Wirkstoffsubstanz

1. Reihenverdünnungstest-Meßwertdifferenzen als mögliche Fehlerquellen

Als letzte Substanz wurde Doxycyclin (Vibramycin) dem Reihenverdünnungstest und Blättchentest unterzogen, um die Beziehung zwischen der minimalen Hemmkonzentration eines Keimes und der gemessenen Hemmhofgröße zu untersuchen. Auch hierbei wurden fünfzig Bakterien der Gattung Escherichia Coli getestet. Wie schon bei Minocyclin und Tetracyclinhydrochlorid wurde auch bei Doxycyclin die minimale Hemmkonzentration eines Keimes im Reihenverdünnungstest durch zwei Testungen an verschiedenen Tagen bestimmt. Es ergaben sich hierbei folgende Unterschiede zwischen 1. und 2. Messung:

Minimale Hemmkonzentration - Unterschiede zwischen 1. und 2. Messung

Kein Unterschied	42 Keime	84%
Unterschied um 1/2 Verdünnungsschritt	8 Keime	16%

Bezogen auf den therapeutisch erreichbaren Blutspiegelwert von 4 mcg/ml Doxycyclin ergab sich folgende Empfindlichkeitsverteilung:

Anzahl der getesteten Keime	% der getesteten Keime	MIC in mcg/ml	Keime
22	44%	3,75	resistent
7	14%	3,75 bis 1,87	empfindlich
16	32%	1,25 bis 0,62	gut empfindlich
5	10%	kleiner als 0,62	sehr empfindlich

Hierbei zeigte es sich jedoch, daß im Gegensatz zu Tetracyclinchlorid, das ebenfalls eine hohe Quote an resistenten Keimen aufwies, bei Doxycyclin nur 11 Keime so resistent waren, daß ihr Wachstum auch durch 20 mcg/ml Doxycyclin-Konzentration nicht gehemmt werden konnte.

2. Blättchentest-Meßwertdifferenzen als mögliche Fehlerquellen

Für den Blättchentest wurden Blättchen mit einer Beschickung von 30 mcg Doxycyclin verwendet und die Hemmhofgröße 6 bis 9 mal bestimmt. In Tabelle 5 bis 6 sind die Mittelwerte der so bestimmten Hemmhofgrößen $\pm$ der jeweiligen größten Abweichungen für jeden Keim eingetragen. Es zeigten dabei:

Hemmhofabweichungen vom Mittelwert bei Mehrfachmessung eines Keimes

Kein Unterschied	17 Keime	34%
Abweichung bis zu $\pm$ 1mm vom Mittelwert	28 Keime	56%
Abweichung bis zu $\pm$ 2mm vom Mittelwert	4 Keime	8%
Abweichung bis zu $\pm$ 3mm vom Mittelwert	1 Keim	2%

Für Doxycyclin sind in Abbildung 3 die Hemmhofgrößen der verschie-

denen Keime in Beziehung gesetzt zu den minimalen Hemmkonzentrationen. Daraus läßt sich folgende Einteilung herleiten:

Einteilung der Hemmhöfe in Hemmkonzentrationsbereiche

Hemmhof	Minimale Hemmkonzentration mcg/ml	Keime
15 mm und kleiner	höher als 3,75	resistent
18 bis 20 mm	3,75 bis 2,5	empfindlich
21 bis 25 mm	1,87 bis 0,62	gut empfindlich
über 26 mm	0,46 und niedriger	sehr gut empfindlich

3. Diskussion der Kurve

Für Doxycyclin gilt die gleiche Beurteilung wie für Minocyclin und Tetracyclinhydrochlorid. In Abbildung 3 ist die Beziehung zwischen der minimalen Hemmkonzentration im Reihenverdünnungstest und der Hemmhofgröße im Blättchentest graphisch dargestellt. Hierbei ist wiederum wegen der Schwankungsbreite der Hemmhofzonen verschiedener Bakterienstämme bei gleicher minimaler Hemmkonzentration nur eine Zuordnung bestimmter Hemmhofdurchmesser zu entsprechenden Empfindlichkeitsbereichen möglich.

H. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurden Untersuchungen über die Korrelation von Reihenverdünnungstest und Hemmhoftest durchgeführt. Ziel der Arbeit war, eine Interpretation des Hemmhoftestes anhand von drei Antibiotika, Minocyclin, Tetracyclin und Doxycyclin zu erreichen, sodaß ausgehend von einer bestimmten Hemmzonengröße genauere Angaben über die Empfindlichkeit eines Keimes möglich sind. Als Bezugsgröße für die Empfindlichkeit eines Keimes wurden die Ergebnisse im parallel zum Hemmhoftest durchgeführten Reihenverdünnungstest verwendet.

Dabei sind alle Faktoren zu berücksichtigen, die die Ergebnisse beider Versuchsabläufe beeinflussen können und es wurde zunächst eine Standardisierung der Versuchsbedingungen angestrebt.

Die im Reihenverdünnungstest festgestellte Empfindlichkeit eines Keimes gegenüber dem jeweils getesteten Antibiotikum, ausgedrückt in der MIC des Keimes, wurde in Beziehung gesetzt zu seinem Hemmzonendurchmesser. Dabei läßt sich eine Regressionsgerade aufstellen, die die Korrelation von Hemmzonendurchmesser und MIC eines Keimes aufzeigt, aber eine so große Streubreite der Ergebnisse aufweist, daß eine Interpretation des Hemmhoftestes mit Hilfe der Regressionsgeraden allein höchstens eine Einteilung der Empfindlichkeiten von Keimen in Bereiche erlaubt wie sehr empfindlich, gut empfindlich, empfindlich nur bei hohen Dosen eines Antibiotikums, sowie resistent.

Das deshalb von mir aufgestellte Test Diagramm berücksichtigt nun auch die Werte im Grenzbereich, sodaß man mit Hilfe dieses Diagramms den gemessenen Hemmhof eines Keimes einer Empfindlichkeit in MIC zuordnen kann.

J. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Hans M. Ericsson, John C. Sherris:
 "Antibiotic Sensivity Testing" Report of an International Collaborative Study.
 Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica
 Section B 1971 Supplement No 217.
 Munksgaard, Copenhagen. Recommendations S. 64 - 81

- 2 J. Zangger:
 "Bakteriensensibilität in vitro und klinisch therapeutische Konsequenz".
 Wiener Klinische Wochenschrift 83. Jahrgang 1971
 Nr. 3 S. 37 - 42

- 3 V.C. Jay, J.C. Sherris:
 "Differences in tetracycline zone sizes on routine and reference media".
 1965 Report prepared in connection with the Collaborative Study of Hans M. Ericsson and John C. Sherris -s. Literaturverzeichnis 1.

- 4 E.D. Weinberg:
 "The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations".
 Bacteriol. Rev. 21:46, 1957

- 5 J. Klustersky, D. Daneau:
 "Bacteriological Evaluation of Minocycline".
 Chemotherapy 17: 51-58. 1972

- 6 A.R. Frisk, G. Tunevall:
 "Clinical Evaluation of Minocycline".
 Antimicrobial agents Chemother. 8: 335 - 339
 1968

- 7 J.A. Washington, P.K.W. Yu, W.Y. Martin:
 "In vitro antibacterial activity of minocycline and effect of agar medium utilized in its susceptibility testing".
 Appl. Microbiol. 19: 259 - 264. 1970

- 8 C.L. Dunsmoor, J.C. Sherris:
"Effect of agar depth on zone size".
Report prepared in connection with the Collaborative study of Hans M. Ericsson and John C. Sherris s. Literaturverzeichnis 1
- 9 A.W. Bauer:
"The significance of bacterial inhibition zone diameters".
A study of the factors influencing antibiotic disk sensitivity tests. In Proceeding of the Third Intern. Congress of Chemotherapy P. 466, Stuttgart
- 10 H. Ericsson, G. Tunevall, K.Wickman:
"A paper disk method for determination of bacterial sensitivity to antibiotics".
Scandinav. J. Clin. 8 Lab. Invest. 12: 414. 1960
- 11 A.L. Barry, R.G. Caudill:
"Evaluation of methods of inoculating antibiotic sensitivity test plates".
Report prepared in connection with the Collaborative Study of Hans M. Ericsson and John C. Sherris - s. Literaturverzeichnis 1
- 12 L.D. Bourgeois, L.J. Hart, L.G. Herman
M.A. Schneiderman, V.M. Young:
"Effect of varying preincubation and Diffusion times on antibiotic disc susceptibility testing".
Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 283. 1965
- 13 R. Cappel M.D., J. Klastersky M.D.:
"Bacteriologic and clinical evaluation of Minocycline, a new tetracycline".
Curr. therapeutic Research Vol 13 No 4. April. 1971
- 14 Dr. Yuzo Kawamori Japan:
"Clinical and Laboratory Research on Minocycline".
Publ. in Jap. Antibiotics 22 (6): 426 - 429. 1969

- 15 G. Pulverer:

"Doxycyclin - ein Breitbandantibioticum der Tetracyclinreihe".

Medizinische Klinik 1969 Nr. 22 S. 1033 - 1037

- 16 Th. Dimmling:

"Bakteriolog. Untersuchungen über Resorption und Exkretion, sowie über das Wirkungsspektrum von Alpha - 6 - Desoxytetracyclin (Doxycyclin)".

Med. Klin. 62, 1269. 1967

- 17 J. Fabre, J.S. Pitton, J.P. Kunz:

"Verteilung und Ausscheidung von Doxycyclin beim Menschen".

Chemotherapia II, 73. 1966

- 18 J. Fabre, J.S. Pitton, C. Virieux

F.L. Laurencet, J.P. Bernhardt, J.C. Godel:

"La doxycycline. Absorption, distribution et excretion d'un nouvel antibiotique à large spectre chez l'homme".

Schweiz. med. Wschr. 97, 915. 1967

- 19 H. Kirchmair, E. Semenitz:

"Untersuchungen mit dem neuen Tetracyclin-Derivat Doxycyclin".

5. Internat. Kongr. f. Chemotherapy Wien 1967

Verhdlg. Bd. 1 S. 179

- 20 Dr. H. Okubo, et al. Japan:

"Laboratory and clinical Experiments on minocycline".

Publ. in Japanese in Jap. J. Antibiotics 22 (6)

430 - 434. Dec. 1969

- 21 L.J. Griffith and C.G. Mullins 1965:
"Relation of "M" concentration and optimum inoculum for disc sensitivity tests".
Report prepared in connection with the Collaborative Study of Hans M. Ericsson and John C. Sherris.
S. Literaturverzeichnis 1
- 22 A.W. Bauer, W.M.M. Kirby, M. Turck:
"Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method".
Amer. J. clin. Path. 45: 493 - 496. 1966



Herrn Prof. Dr. W. Lang gilt für die Überlassung des
Themas und für seine wertvollen Anregungen mein beson-
derer Dank.

Ich danke auch meinen Eltern sehr herzlich, die mir in
dieser Zeit stets zur Seite standen.



L E B E N S L A U F

geboren:	9. Januar 1947 in Ellwangen
Elten:	Dr. Max Hofmann, prakt.Arzt Doris Hofmann, geb. Rupp
Geschwister:	Sigrid Spann, geb. Hofmann, Gymnasial- lehrerin Doris Hofmann, Studentin
1953 - 57	Besuch der Volksschule Röhlingen
1957 - 66	Peutinger Gymnasium Ellwangen
April 1966	Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig Maximilian Universität München
Februar 1967	Vorphysikum
Mai 1968 μ	Austritt aus der Universität
1. April 1969	Wiederaufnahme des Medizinstudiums an der Ludwig Maximilians Universität München
Okt. 1970	Ärztliche Vorprüfung
Dez. 1973	Ärztliche Prüfung





